DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.14.034

而且扩大了肿瘤研究的范围。各种小分子和大分子造影剂的成功研制使得结果也越来越客观,可靠。最近几年已经深入到分水水平[6]。因此应用MRI评价血管生成有很大前景。国内在这方面起步较晚,研究多局限于影像学表现与血管生成的指标相对照。相信随着软硬件的进一步完善,国内影像学工作者也会逐步着手这方面的研究并能取得较好的成果。

参考文献:

[1] 耿道颖,沈天真,陈星荣.星形胶质细胞瘤MR诊断有关定量参数研究[J].中国医学计算机成像杂志,1996,2(2):75-79.
[2] 王文献,邹利光,张 冬,等.MRI定量分析在星形细胞瘤鉴别诊断中的作用[J].中国医学影像学杂志,2002,10(5):332-334.
[3] Leon S P, Folkerth R D, Blank P M. Microvessel density is a prognostic indicator for patients with astroglial brain tumors[J]. Cancer, 1996, 77(2): 362-372.
[4] Tovi M, Lilja A, Bergstrom M, *et al*. Delineation of gliomas with magnetic resonance imaging using Gd-DTPA comparision with computed tomography and position emission tomography[J]. Acta Ragiol, 1990, 31(5): 417-429.
[5] Abramovitch R, Dafni H, Smouha E, *et al*. *In vivo* prediction of vascular susceptibility to vacular endothelial growth factor withdrawl magnetic resonance imaging of C6 rat glioma in nude mice[J]. Cancer Res, 1999, 59(19): 5012-5016.
[6] Sipkins D A, Cheresh D A, Kazemi M R, *et al*. Detection of tumor angiogenesis *in vivo* by alphaVbeta3-targeted magnetic resonance imaging[J]. Nat Med, 1998, 4(5): 623-626.

(编辑 王 红)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2004)14-1310-02

豚鼠内淋巴囊透明质酸合成酶原位杂交方法的初探

Detection of hyaluronan synthase in the endolymphatic sac of guinea pigs by *in situ* hybridization

陈 剑,姬长友 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所耳鼻咽喉头颈外科,重庆市内耳疾病研究所,重庆 400042)

目前在豚鼠内淋巴囊进行原位杂交的方法欠稳定,本研究总结出一种豚鼠内淋巴囊透明质酸合成酶原位杂交的方法,现报告如下。

1 材料和方法

1.1 探针来源

查阅基因文库,得出透明质酸合成酶的保守序列,设计寡聚核苷酸探针为:5′-RAA RTA NSW YTT NGT CCA NCK NGT YTG YTG-3′ R=A or G, N=A、C、G or T, W=A or T, Y=C or T, K=G or T, S=C or G,由上海生物制品研究所合成。

1.2 标本预处理

1.2.1 固定 取新鲜内淋巴囊,4%多聚甲醛固定3 h,30%蔗糖脱水24 h至标本悬浮(因内淋巴囊很小,投入液体中是漂在液面上)。

1.2.2 载玻片和组织切片的处理 载玻片先经酸处理,然后用热的肥皂水浸泡24 h,清水清洗干净,然后用蒸馏水浸泡4 h,160 ℃以上烘烤干,去RNA酶备用。然后用推片法在载玻片上涂一层多聚赖氨酸(PLL,北京中山生物技术有限公司,0.1~0.5%),4 ℃备用。

1.2.3 制片 用涂有多聚赖氨酸的载玻片冰冻切片,14 μm,置-20 ℃备用。最好是新鲜制片。

1.3 杂交前预处理

预处理标本38 ℃烤箱,10 min,除去载玻片上的水分。PBS漂洗10 min×2次。蛋白酶K(10 μg/ml,DEPC水配制):37 ℃,5 min。PBS漂洗10 min×2次。

1.4 预杂交和杂交

1.4.1 预杂交 滴加预杂交液(100%甲酰胺5 ml,50 Denherolts 1 ml,20×s 2.5 ml,5 mg/ml鲑鱼精DNA 40 μl,DEPC水1.46 ml)37 ℃,30 min至1 h。

1.4.2 杂交 在预杂交的同时,将探针用封口膜封好,然后沸水水浴加热10 min。探针解链,然后在预杂交液中加入探针(100∶1),除去载玻片上的预杂交液,每张载玻片上滴加约30 μl的杂交液,加盖盖玻片,37 ℃,12~16 h。

1.5 杂交后处理

2×s,0.4% Triton-X-100,42 ℃漂洗10 min×2次。0.1×s,0.4% Triton-X-100,42 ℃漂洗10 min×2次。bufferⅠ(mol/L)(0.15 NaCl,0.1马来酸)漂洗10×2次min。bufferⅡ(bufferⅠ配制,含10%的阻断剂),封阻,30 min。加Dig-AP(bufferⅡ配制,1∶1 000),37 ℃,2~3 h。bufferⅠ,漂洗10 min×次。bufferⅢ(mol/L)(0.1 Tris-HCl pH9.5,0.1 NaCl,0.05 MgCl):平衡,10 min。NBT-BCIP避光显色,(bufferⅢ配制,1∶100),2~4 h。1×TE:中

(下转1313页)

基金项目:重庆市应用基础研究资助项目(1999)
Supported by the Research Project Foundation for Basic Research and Application of Chongqing (1999)
作者简介:陈 剑(1978-),男,四川省仁寿县人,技师,主要从事耳鼻咽喉头颈外科方面的研究。电话:(023)68757630
收稿日期:2002-02-23;修回日期:2003-09-28

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

重要分支血管闭塞等并发症, 考虑外科手术治疗。

参考文献:

[1] Fuster V, Halperin J L. Aortic dissection: a medical perspective[J]. J Card Surg, 1994, 9(6): 713－728.

[2] 孙　明, 漆　泓. 主动脉夹层动脉瘤诊断与治疗进展[J]. 中国医师杂志, 2001, 3(9): 646－648.

[3] 齐华阁, 齐向东, 陈秀丽. 主动脉夹层分离的早期诊断[J]. 医学综述, 1998, 4(7): 351－352.

[4] Shicely B K. Transesophageal echocardiography in the diagnosis of aortic disease[J]. Semin Ultrasound CT MR, 1993, 14(2): 106－108.

[5] Castaner E, Andreu M, Gallardo X, *et al*. CT in nontraumatic acute thoracic aortic disease: typical and atypical features and complications[J]. Radiographics, 2003, 23(S1): 93－110.

[6] Barbant S D, Eisenberg M J, Schiller N B. The diagnostic value of imaging techniques for aortic dissection[J]. Am Heart J, 1992, 124(2): 541.

[7] Pereles F S, McCarthy R M, Baskaran V, *et al*. Thoracic aortic dissection and aneurysm: evaluation with nonenhanced true FISP MR angiography in less than 4 minutes[J]. Radiology, 2002, 223(1): 270－274.

[8] Arpasi P J, Bis K G, Shetty A N, *et al*. MR angiography of the thoracic aorta with an electrocardiographical triggered breath-hold contrast-enhanced sequence[J]. Radiographics, 2000, 20(1): 107－120.

[9] Jing Zp, Feng X, Bao Jm, *et al*. Endovascular graft exclusion for Stanford B type thoracic aortic dissection aneurysms: a report of 91 cases[J]. J Surg Concepts Pract, 2001, 6(6): 372－375.

[10] Czermak B V, Waldenberger P, Freaedrich G, *et al*. Treatment of Stanford type B aortic dissection with stend-grafts: prelimimary results[J]. Radiology, 2000, 217(2): 544－550.

[11] Lopera J, Patino J H, Urbina C, *et al*. Endovascular treatment of complicated type-B aortic dissection with stend-grafts: midterm results[J]. JVIR, 2003, 14(2): 195－203.

(编辑　栗　嘉)

(上接 1310 页)

止反应, 10 min。系列乙醇(70%, 80%, 90%, 100%两次)脱水, 二甲苯透明, DPX 封片。

1.6　对照实验

每组实验中均设置了阴性对照(不加寡聚核苷酸探针)和免疫组化染色。

2　结果

内淋巴囊上皮细胞胞浆内出现紫蓝色颗粒状沉淀, 阴性对照中没有出现紫蓝色颗粒状沉淀。

3　讨论

与以往所采用的^{35}S、^{3}H 或生物素标记探针相比, 地高辛标记探针具有诸多优点, 它克服了同位素探针的缺点(受半衰期限制, 曝光时间长, 背景结构欠清晰, 污物处理困难等), 也避免了内源性生物素对实验结果的干扰, 具有方法简便、安全、结构清晰, 有较高灵敏性、探针能放置较长时间等优点[1]。在实际操作中有以下关键步骤值得注意。

3.1　标本的预处理

组织切片应新鲜取材, 立即进行固定和脱水, 尽快进行杂交实验。因为空气中含有很多 RNA 酶, 如果此过程在空气中曝露的时间越长, 杂交的信号就越弱。

3.2　杂交前处理

杂交前处理的一个关键性步骤是蛋白酶 K 的消化, 并符合以下条件: 冰冻切片厚度 14 μm, 37 ℃, 5 min。

3.3　关于杂交条件

探针过长, 造成杂交率低, 杂交时间长; 探针过短, 非特异性增强。浓度过高, 易造成背景着色很高和试剂的浪费; 过低, 杂交率很低, 达不到杂交的目的。且探针的浓度和长度与不同的取材最佳条件应为 500 μg/L, 30 bp, 温度 37 ℃, 12 ~ 16 h。

3.4　关于杂交后处理

3.4.1　染色质量的好坏很大程度上取决于杂交后高严谨(低盐高温)的洗脱过程。漂洗的时间过长, 浓度过高, 可明显降低背景非特异性染色, 但这样也容易造成特异性杂交信号渐趋消失, 出现假阴性, 反之, 易出现假阳性。本实验采用两个不同浓度(2×, 0.1×)的漂洗, 即可达到理想的实验结果。

本实验采用 0.15 mol/L NaCl, 0.1 mol/L 马来酸, 有利于探针和地高辛 AP 的特异性结合, 减少背景。漂洗温度确定在 42 ℃ 可减少 SP2 特异性结合, 提高检验效率。

3.4.2　NBT-BCIP 显色的浓度, 本实验确定为 1%的浓度, 既不浪费试剂又能得到满意的结果。显色的时间受环境温度影响: 环境温度高, 显色时间短; 环境温度低, 显色时间长。

3.5　关于脱片的处理

由于原位杂交的程序较多, 因而易脱片, 其原因有两点: ①载玻片处理不彻底; ②蛋白酶 K 的过度消化, 不仅可引起细胞形态的改变及靶核酸减少, 也会导致标本从载玻片上脱落。通过在载玻片上涂上粘附剂(多聚赖氨酸)能达到较好的实验目的。另目前国外市场上已有专供原位杂交的 Probe-on 载玻片出售, 此种载玻片不需任何处理, 可直接用于承载细胞和组织进行实验[2]。

关键词: 内淋巴囊; 透明质酸合成酶; mRNA; 原位杂交
中图法分类号: R394.33　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 杜卫东, 周晓虹, 马学玲, 等. 地高辛标记 cDNA 探针组织及细胞 mRNA 原位杂交技术[J]. 临床与实验病理学杂志, 1997, 13(1): 77－79.

[2] 周立新, 袁建成, 肖光夏. 影响地高辛标记 TNF cDNA 探针原位杂交效果的因素[J]. 第三军医大学学报, 1995, 17(4): 338－340.

(编辑　陈聪连)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net